



## **XII Congreso Argentino de Virología**

**V Simposio de Virología Clínica**

**III Simposio de Virología Veterinaria**

### **Libro de resúmenes**

**26 al 28 de septiembre de 2017**

**Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina**

**Centro de Convenciones Palais Rouge**

Jerónimo Salguero 1443/49

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

celulares como Vero, BHK-21 y RK-13 y cepas diferentes en cada uno de los estudios resultando difícil extrapolar los resultados obtenidos.

**Objetivo:** El objetivo de este trabajo fue evidenciar cambios morfológicos asociados a la apoptosis en cada una de las líneas celulares infectadas mediante tinción con Naranja de Acridina/Bromuro de Etidio. Del mismo modo, se analizaron cambios genéticos de expresión mediante la activación de caspasa 3 y de la vía extrínseca de apoptosis vía caspasa 8, como así también mediante el análisis de la fragmentación del ADN celular.

**Metodología:** Las diferentes monocapas de cada una de las líneas celulares mencionadas, fueron infectadas con la cepa Bucyrus de referencia a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 y se recolectaron muestras entre las 24 y 96 hs post infección dependiendo de la línea celular utilizada. Las monocapas celulares sin infectar y cultivos celulares en presencia de Staurosporina fueron utilizados como controles negativos y positivos respectivamente. Para el análisis de cambios morfológicos asociados a la apoptosis se tiñeron las células con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio y analizaron al microscopio de fluorescencia. La activación de las caspasas se realizó in situ en cada uno de los cultivos mediante el empleo de anticuerpos específicos y el revelado empleando Aminoetilcarbazon (AEC) como sustrato de la peroxidasa. La fragmentación del ADN celular se realizó mediante la extracción de ADN y la corrida electroforética en geles de agarosa.

**Resultados:** En las tres líneas celulares se evidenciaron cambios morfológicos correspondientes a la apoptosis a las 24 hpi para las Vero y RK-13 y a las 48 hpi en BHK-21. La fragmentación del ADN se observó a diferentes hpi para cada línea celular: 48, 72 y 96 hpi para las RK-13, Vero y BHK-1 respectivamente. La activación de la caspasa efectora 3 se detectó en las tres líneas celulares, mientras que la caspasa 8 indicativa de la vía extrínseca de apoptosis no se detectó en las células BHK-21 a ninguno de los tiempos estudiados.

**Conclusión:** El VAE induce cambios morfológicos en las tres líneas celulares y a una cinética de activación diferente en cada una de ellas de acuerdo a la fragmentación del ADN celular. Si bien el mecanismo de apoptosis fue evidenciado en las tres líneas celulares mediante la activación de la caspasa 3, la vía extrínseca de apoptosis mediante caspasa 8 no pudo detectarse en las células BHK-21.

## VET 17

### ASLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PARVOVIRUS PORCINO EN ARGENTINA

Aspitia C G<sup>1,2</sup>, Cappuccio J A<sup>3,4</sup>, Dibarbora M<sup>4</sup>, Metz G E<sup>2,3</sup>, Echeverría M G<sup>2,5</sup>, Serena M S<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Becaria CIC. <sup>2</sup>LAVIR-FCV-UNLP. <sup>3</sup>Investigador Asistente CONICET. <sup>4</sup>INTA Marcos Juárez. <sup>5</sup>Investigador Principal CONICET.

El Parvovirus porcino (PPV) pertenece a la familia *Parvoviridae* y es de genoma ADN de cadena simple. Está ampliamente distribuido en la población porcina de cerdos domésticos y salvajes, y es la causa infecciosa más importante asociado a fallas reproductivas. Varios trabajos han reportado la variación genética del PPV demostrando que cepas de campo son genéticamente diferentes a las cepas de referencias y/o vacunales. En la Argentina las fallas reproductivas causadas por el virus agneno causan problema con menor número de nacidos vivos y consecuentes pérdidas económicas. Los objetivos de este trabajo fueron identificar la presencia de PPV en fetos de una granja porcina con sanidad controlada, realizar el primer aislamiento en cultivo celular y posteriormente analizar la variabilidad genética de las cepas aisladas. Se recolectaron 131 fetos y/o momias de una granja porcina de cría intensiva ubicada en la provincia de Santa Fe. En forma estéril se extrajeron muestras de órganos que fueron procesadas para aislamiento viral y extracción de ADN utilizando kit comercial. Para el aislamiento viral se utilizaron células CPK) crecidas en MEM con 10% de suero fetal bovino. El título infeccioso se determinó mediante la técnica de Hemoaglutinación. La presencia del genoma viral tanto en las células infectadas como en los pools de órganos analizados de cada feto fue detectada por PCR con la utilización de cebadores específicos para el gen que codifica para NS1 (145bp). Posteriormente, se amplificó el fragmento que codifica para VP2 (530pb), el cual fue purificado y secuenciado. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante NCBI BLAST y el programa MEGA7.0 fue utilizado para el estudio de variabilidad genética realizado con secuencias disponibles en el

Genbank. Del total de fetos analizados, 16 de ellos resultaron positivos a la técnica de PCR utilizando cebadores para NS1. A partir de la secuenciación del fragmento VP2 se obtuvieron 10 secuencias que fueron comparadas con las de referencia disponibles en la base de datos. Se lograron 4 aislamientos en CPK de los cuales sólo uno fue citopático. El título viral de los aislamientos osciló entre 1:64 y 1:256 UH. Todas las secuencias argentinas mostraron alto porcentaje de similitud entre sí y todas pertenecen al tipo Parvovirus porcino tipo 1 (PPV1) con un 100% de identidad con la cepa de referencia NADL-2. Mediante este estudio se lograron aislar las primeras cepas de PPV reportadas en Argentina. Este trabajo abre el camino a futuros análisis en diferentes zonas de nuestro país, que con el aislamiento de nuevas cepas así como la obtención de fragmentos del genoma y el estudio de variabilidad genética permitirán analizar la protección de las vacunas actuales y responder a nuevas demandas de inmunógenos capaces de controlar dicha enfermedad.

## VET 18

### IMPORTANCIA DE LAS PROTEÍNAS DE SUPERFICIE Y TRANSMEMBRANAL CON EL DESARROLLO DE LAS FASES CLÍNICAS RELACIONADAS A LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LEUCEMIA BOVINA EN VACAS LECHERAS

Cerón T F, Montero M N, Martínez R H A, Tórtora P J L, Ramírez A H

Laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km. 2.5, San Sebastián Xhala, 54714 Cuautitlán Izcalli, México.

El virus de leucemia bovina (BLV) es un retrovirus perteneciente al género *deltaretrovirus*, agente causal de la leucosis enzoótica bovina. Actualmente clasificado en 10 genotipos diferentes a nivel mundial. La principal célula diana del virus son los linfocitos B. En la mayoría de los animales infectados no se presentan cuadros clínicos, no obstante, de un 30 al 70% presenta expansión policlonal no maligna de células B llamada linfocitosis persistente (LP) y sólo entre un 5 al 10% de los bovinos infectados desarrollan la forma clínica que es linfosarcoma. En otras infecciones (lentivirus) se ha asociado la genética viral con el desarrollo de cuadros clínicos específicos no así en la infección por BLV, además en México, no existen datos epidemiológicos actualizados de la infección y de los genotipos del BLV que infectan el ganado lechero mexicano.

El objetivo de este trabajo fue identificar regiones aminoácidas variables en las proteínas de superficie y transmembranal del BLV y su posible asociación genotípica con las diferentes fases de infección (asintomáticas, LP y tumoral). A partir de muestras de sangre obtenidas de bovinos destinados a la producción láctea de 6 estados de México, fue separado el plasma y los leucocitos de sangre periférica (LSP), el plasma se utilizó para la detección de anticuerpos contra BLV utilizando un ELISA comercial y los LSP se utilizaron para la detección de ADN proviral y su posterior secuenciación. Se diseñaron 3 juegos de iniciadores con los que se obtuvieron productos de 749pb, 757pb y 674pb respectivamente, el armado de la secuencia completa del gen *env* del BLV (1548 bases) se logró utilizando programas bioinformáticos. Se establecieron 3 grupos de estudio basados en la fase clínica, 12 fueron asintomáticos, 12 con LP y 8 muestras de tejido tumoral (abomaso y corazón) (n=32). Para identificar el genotipo viral se construyó un árbol filogenético con secuencias nucleotídicas de referencia y las obtenidas en el trabajo, identificando a todas las secuencias dentro del genotipo 1 con excepción de una muestra con LP, la cual fue asociada al genotipo 3. Con las secuencias mexicanas se realizó una matriz de identidad obteniendo rangos de similitud de 0.983 a 0.998, lo que evidencia una alta similitud. No fue posible identificar secuencias de aminoácidos que establecieran patrones conservados según la fase de infección.

Sin embargo, el análisis de aminoácidos de las secuencias de Env de BLV Mexicanas reveló una sustitución de Isoleucina a Trionina, presentándose en la región del péptido de unión al zinc específico para el reconocimiento de anticuerpos del epítipo-H reportada en otros estudios. Dicho aminoácido fue altamente conservado en la mayoría de las secuencias analizadas.

Nuestro estudio mostró que las secuencias analizadas de BLV principalmente son del genotipo 1, esto podría indicar una asociación con la importación de ganado a nuestro país.